



## Potensi Pemanfaatan Umbi Bit (*Beta vulgaris*) Sebagai Immunomodulator dalam Meningkatkan Fagositosis Makrofag dan Proliferasi Limfosit

Aji Winanta<sup>1\*</sup>, Perdana Priya Haresmita<sup>2</sup> dan Seputri Merilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Jl. Brawijaya, Geblagan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta, Indonesia 55183

<sup>2</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Magelang, Jl. Mayjen Bambang Soegeng, Magelang, Indonesia, 56172.

\*email korespondensi: [ajjwinanta@umy.ac.id](mailto:ajjwinanta@umy.ac.id)

Diterima 02 Februari 2023, Disetujui 11 Oktober 2023, Dipublikasi 6 November 2023

**Abstrak:** Tanaman Bit (*Beta vulgaris L*) merupakan salah satu tanaman yang paling banyak dimanfaatkan masyarakat Indonesia yaitu sebagai bahan pangan yang kaya vitamin dan mineral. Pigmen merah yang ada di dalam tanaman bit merupakan senyawa nitrogen dengan aktivitas antioksidan tinggi. Senyawa kimia sebagai antioksidan dalam umbi bit polifenol, betalain, dan flavonoid. Berbagai jenis patogen seperti bakteri, virus, protozoa, dan parasit banyak ditemukan di lingkungan sekitar sehingga dapat menimbulkan berbagai infeksi pada manusia. Mekanisme pertahanan diri dalam tubuh manusia merupakan komponen dalam melawan senyawa patogen tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol umbi bit, menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol umbi bit dan menentukan aktivitas immunomodulator ekstrak etanol umbi bit secara *in vitro*. Ekstraksi umbi bit dipilih metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan analisis kualitatif dipilih metode kromatografi lapis tipis (KLT). Analisis kuantitatif penentuan kadar flavonoid total dilaksanakan dengan metode kolorimetri dan penentuan aktivitas immunomodulator secara *in vitro* dilakukan dengan parameter indeks fagositosis, kapasitas fagositosis serta indeks stimulasi proliferasi. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol umbi bit mengandung flavonoid. Nilai kadar flavonoid total yang diperoleh dari ekstrak etanol umbi bit adalah sebesar 1,43 mgEK/g ekstrak. Penentuan aktivitas immunomodulator ekstrak etanol umbi bit menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag yang berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kontrol sel. Konsentrasi 500 µg/mL menunjukkan aktivitas paling tinggi yaitu kapasitas fagositosis 82% ± 0,03 dan indeks fagositosis 4,46 ± 0,31 namun tidak memiliki aktivitas dalam meningkatkan proliferasi limfosit. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol umbi bit mempunyai potensi sebagai immunomodulator kuat.

**Kata kunci:** Umbi bit; Flavonoid total; Parameter immunomodulator; Fagositosis makrofag; Proliferasi limfosit

**Abstract. Potential Use of Beetroot (*Beta vulgaris*) as an Immunomodulator for Increasing Macrophage Phagocytosis and Lymphocyte Proliferation.** Beet (*Beta vulgaris L*) is one of the most widely used plants in Indonesia, as a food ingredient that is rich in vitamins and minerals. Beet plants contain red pigment which is a nitrogen compound with high antioxidant activity. The antioxidant in beetroot contains polyphenols, betalains, and flavonoids. Various types of pathogens such as bacteria, viruses, protozoa, and parasites are found in the environment around humans so that they can cause various infections in humans. To fight these pathogenic compounds, the human body must be equipped with a self-defense mechanism. The aim of this study was to determine the flavonoid content compounds, total flavonoid content the immunomodulatory activity of the ethanol extract of beetroot. Extraction method was maceration with 70% ethanol solvent and qualitative analysis method was thin

layer chromatography. Quantitative analysis to determine total flavonoid content was carried out using the colorimetric method and the determination of immunomodulatory activity was carried out using phagocytosis index, phagocytosis capacity and proliferation stimulation index parameters. The results showed that beetroot ethanol extract was contained flavonoids. The value of total flavonoid content obtained from the ethanol extract of beetroot was 1.43 mgEK/g extract. Determination of the immunomodulatory activity showed that macrophage phagocytic activity of the beetroot ethanol extract significantly different compared to the control. The concentration of 500  $\mu\text{g/mL}$  showed the highest activity, namely phagocytosis capacity of  $82\% \pm 0.03$  and phagocytosis index of  $4.46 \pm 0.31$ . The proliferation stimulation index showed that the results obtained have no activity in increasing lymphocyte proliferation.

**Keywords:** Beetroot; Total flavonoids; Immunomodulators; Macrophage phagocytosis; Lymphocyte proliferation

---

## 1. Pendahuluan

Infeksi adalah salah satu penyebab dapat terjadinya gangguan pada sistem imun. Gangguan sistem imun juga akan mempengaruhi produksi senyawa oksidan dalam tubuh. Produksi tinggi oksidan tinggi dalam tubuh karena infeksi akan mempengaruhi sistem imun dalam tubuh bahkan dapat merusak organ. Adanya antioksidan diharapkan dapat menjadi solusi bagi tingginya jumlah oksidan dalam tubuh sekaligus menjaga sistem imun dalam kondisi optimal. Pendekatan yang digunakan adalah penggunaan tanaman obat sebagai pengobatan alternatif dianggap cukup efektif dan aman karena efek samping yang ditimbulkan lebih kecil dan mempunyai harga lebih murah (Rodríguez dkk., 2018; Wardhani dan Sulistyani, 2013).

Tanaman obat sebagai alternatif senyawa dengan aktivitas antioksidan dalam umbi bit dapat juga mempunyai aktivitas imunomodulator (Sygitowicz dan Sitkiewicz, 2020). Umbi bit (*Beta vulgaris* L) mengandung pigmen merah yaitu senyawa antosianin dan senyawa bernitrogen dengan aktivitas antioksidan tinggi. Menurut penelitian sebelumnya, umbi bit mempunyai aktivitas antioksidan dengan  $\text{IC}_{50}$  sebesar 21,88  $\mu\text{g/mL}$  dan diduga senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan tersebut adalah betasianin (Asra dkk., 2020). Kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan pada umbi bit yaitu senyawa polifenol, betalain, betasianin dan flavonoid (Anam dkk., 2013; Asra dkk., 2020). Adanya pigmen warna merah dan kandungan flavonoid yang banyak sehingga berpotensi untuk memiliki efek imunomodulator. Penelitian ini dilakukan karena penentuan aktivitas imunomodulator umbi bit secara *in vitro* belum pernah dilakukan sebelumnya sehingga hasil penelitian dapat memberikan informasi baru tentang pemanfaatan umbi bit di masyarakat sebagai imunomodulator.

Salah satu kelas terbesar senyawa polifenol alami adalah flavonoid (Garmana dkk., 2014). Usaha meningkatkan sistem imun pada tubuh dapat dilakukan menggunakan tanaman obat. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa imunostimulan merupakan suatu zat yang dapat memperkuat sistem pertahanan tubuh. Mekanisme pertahanan tubuh yang dilakukan adalah

dengan melindungi diri dan mencegah dari infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme (Radji, 2015). Bakteri, virus, jamur, protozoa, dan parasit merupakan berbagai macam organisme yang dapat menimbulkan berbagai infeksi pada manusia. Untuk melawan berbagai patogen tersebut, tubuh manusia harus dilengkapi dengan sistem pertahanan atau sistem imun dalam tubuh yang prima. Kandungan antioksidan umbi bit adalah senyawa flavonoid dan mempunyai potensi meningkatkan sistem imun tubuh. Senyawa alami yang berkontribusi meningkatkan aktivitas sistem imun biasanya adalah flavonoid, kurkumin, limonoid, vitamin C, vitamin E (tokoferol) dan katekin (Patle dkk., 2020). Beberapa penelitian bahan alam menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dan fenolik dapat meningkatkan sistemn imun melalui peningkatan aktivitas fagositosis makrofag. Senyawa flavonoid secara farmakologis memperbaiki sistem kekebalan tubuh dan sel-sel pro inflamasi, termasuk sel T, Sel B, neutrophil, makrofag, sel mast dan basophil (Kanjwani et al., 2008; García-Lafuente et al., 2009). Betasianin pada umbi bit telah diteliti memiliki efek penangkapan senyawa radikal dan aktivitas antioksidan yang tinggi (Selvira dkk., 2021; Setiawan dkk., 2016). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian ekstrak petroleum eter bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terbukti dapat menaikkan kapasitas dan indeks fagositosis makrofag serta proliferasi limfosit secara signifikan (Sujono dkk., 2022). Aktivitas imunomodulator dari ekstrak meniran telah banyak terbukti dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, proliferasi sel B dan Sel T (Nworu et al., 2010; Zalizar, 2013). Sehingga, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator (fagositosis makrofag dan proliferasi limfosit) ekstrak etanol umbi bit secara *in vitro* serta analisis kandungan flavonoidnya.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Alat dan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol umbi bit, pelarut berderajat teknis (etanol 70% (*General Labora*<sup>®</sup>)), pelarut berderajat pro analisis (metanol (*Merck*<sup>®</sup>), kloroform (*Merck*<sup>®</sup>), dimetilsulfoksida (DMSO) (*Merck*<sup>®</sup>)), aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) (*Merck*<sup>®</sup>), natrium asetat (*Merck*<sup>®</sup>), rutin (*Sigma*<sup>®</sup>), kuersetin (*Sigma*<sup>®</sup>), mencit BALB/c jantan berusia 2-3 bulan, media cair *Roswell Park Memorial institute* (RPMI)-1640 (*Sigma*<sup>®</sup>), phosphate-buffered saline (PBS) (*Sigma*<sup>®</sup>), latex beads dengan diameter 3  $\mu m$  (*Sigma*<sup>®</sup>), pewarna giemsa (*Merck*<sup>®</sup>), silika gel GF<sub>254</sub> (*Merck*<sup>®</sup>), reagen semprot amoniak (*Merck*<sup>®</sup>), buffer tris ammonium chloride (*Merck*<sup>®</sup>), antigen vaksin (*Euvax B*<sup>®</sup>), SDS asam klorida 0,01 N (*Merck*<sup>®</sup>), 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) (*Merck*<sup>®</sup>).

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu rotary evaporator (*Stuart*<sup>®</sup>), blender (*Philips*<sup>®</sup>), waterbath (*Memmert*<sup>®</sup>), yellow tip (*Brand*<sup>®</sup>), blue tip (*Brand*<sup>®</sup>),

pipa kapiler (Pyrex<sup>®</sup>), Chamber (Camag Linomat 5<sup>®</sup>), mikropipet (Socorex<sup>®</sup>), microplate reader (Rayto RT2100C<sup>®</sup>), inkubator CO<sub>2</sub> (Heraeus<sup>®</sup>), kuvet (Kuvet disposable<sup>®</sup>), hemositometer (Newbauer<sup>®</sup>), cawan petri (Pyrex<sup>®</sup>), 96-well multiwell plate (Nuc, Inggris<sup>®</sup>), coverslip (2001212mM<sup>®</sup>) (SPL, Korea<sup>®</sup>), spuit injeksi (Terumo, Jepang<sup>®</sup>), sentrifus (Sorvall, Amerika<sup>®</sup>), mikroskop cahaya (Olympus CX 21<sup>®</sup>), timbangan analitik (Sartorius<sup>®</sup>), alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>), oven (Mettler<sup>®</sup>), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu<sup>®</sup>), lampu UV 254 nm dan 366 nm (MiuLab<sup>®</sup>), (Herma<sup>®</sup>), Laminar Air Flow (LAF) (LabTech<sup>®</sup>), autoklaf (Allamerican<sup>®</sup>).

## 2.2. Determinasi tanaman

Tumbuhan umbi bit (*Beta vulgaris* L) dilakukan identifikasi di Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan.

## 2.3. Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk

Umbi bit (*Beta vulgaris* L) sejumlah 2 kg diperoleh dari kota Malang, Lowakwaru, Jawa Timur. Sampel kemudian dipanen dan dipisahkan umbi dari bagian tanaman yang lainnya untuk dibersihkan dan dipotong tipis. Potongan umbi selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 24 jam. Umbi yang sudah kering kemudian dihaluskan dan diayak untuk didapatkan serbuk simplisia.

## 2.4. Pembuatan ekstrak etanol umbi bit

Proses ekstraksi sebanyak 500 gram serbuk simplisia umbi bit menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% perbandingan sampel dan pelarut adalah 1:5. Serbuk umbi bit kemudian dimasukkan ke dalam bejana tertutup selama 2-3 hari, serbuk direndam dengan etanol 70% serta dihindarkan dari sinar matahari langsung dan diaduk setiap hari. Maserat yang telah diperoleh tersebut disaring menggunakan kain flanel dan dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari dengan proses yang sama.

## 2.5. Uji kandungan senyawa kimia metode KLT

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid pada umbi bit dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam yang digunakan pada uji ini adalah silika gel GF<sub>254</sub>, dengan fase gerak metanol:air (9:1) (Podungge dkk., 2017). Ekstrak etanol umbi bit sebagai sampel uji ditotolkan pada fase diam menggunakan pipa kapiler pada plat silika gel GF<sub>254</sub>. kemudian dielusi dengan fase gerak pada bejana tertutup. Setelah fase gerak sudah terelusi dengan sempurna, plat silika dikeringkan lalu diamati di bawah sinar tampak, sinar UV 254 nm, 366 nm untuk dilakukan perhitungan secara kuantitatif berupa nilai R<sub>f</sub>. Untuk reaksi warna senyawa flavonoid, plat silika disemprot dengan reagen semprot amoniak dan ditunggu selama 15 menit kemudian diamati warna bercak yang timbul.

## 2.6. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol umbi bit menggunakan spektrofotometri visible dengan pereaksi aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) yang telah dimodifikasi (Suharyanto dan Hayati, 2021). Larutan sampel berupa ekstrak sebanyak 20.000 ppm di pipet 0,5 mL, ditambah 1,5 mL metanol, 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$ , dan 0,1 mL natrium asetat 1 M, kemudian ditambahkan akuadest sampai 5 mL untuk membuat larutan standar kuersetin sebanyak 5 mL. Larutan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (*operating time* yang didapatkan 30-50 menit). Absorbansi larutan selanjutnya diukur pada panjang gelombang 425 nm terhadap blanko reagen yang terdiri dari 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$ , 0,2 mL natrium asetat, 3,0 mL metanol dan ditambahkan akuades sampai 5 mL. Sampel ditetapkan kadarnya sebanyak 3 kali. Kurva baku ditentukan menggunakan larutan standar kuersetin dengan seri konsentrasi 2; 3; 4; 5 dan 6  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 5 mg baku standar kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL etanol 70% sehingga diperoleh konsentrasi 500 ppm, kemudian dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin ditambahkan 1,5 mL metanol, 0,1 mL  $\text{AlCl}_3$  dan 0,1 mL natrium asetat 1 M, lalu ditambahkan akuadest hingga garis batas 5 mL. Larutan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yaitu 425 nm (Kemenkes RI, 2017). Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai miligram ekuivalen kuersetin tiap gram sampel (mg EK/g sampel) (Munawaroh dkk., 2018).

## 2.7. Uji aktivitas fagositosis makrofag

### 2.7.1. Isolasi dan kultur sel makrofag peritoneal

Makrofag diekstraksi dari cairan peritoneal mencit galur BALB/c jantan berusia 2-3 bulan. Sebanyak 10 mL media RPMI 1640 dingin disuntikkan ke dalam rongga peritoneum mencit kemudian digoyang dan diketuk perlahan selama 5-10 menit agar makrofag yang menempel dalam rongga peritoneum dapat terlepas dan tersuspensi ke dalam media. Cairan peritoneum diambil dengan spuit injeksi secara hati-hati dan dimasukkan ke dalam *conical*. Cairan peritoneum kemudian disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Sebanyak 4,5 mL medium RPMI 1640 komplet (mengandung FBS 10% v/v) kemudian ditambahkan pada sedimen pelet. Sel dihitung dengan hemositometer dan kemudian disuspensikan kembali dalam medium RPMI komplet untuk menghasilkan suspensi sel sebanyak  $2,5 \times 10^6$  sel/mL. Kultur suspensi sel kemudian dimasukkan ke dalam 24-well plate yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran diisi 300  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  sel), didiamkan selama 30 menit, kemudian ditambah medium RPMI komplet 700  $\mu\text{L}$ /sumuran dan diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Munawaroh dkk., 2018).

### 2.7.2. Uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro*

Sel makrofag yang telah dikultur selama 24 jam kemudian media cairnya diambil dengan pipet sehingga hanya tertinggal makrofag yang menempel di *coverslips*. Ekstrak dibuat seri konsentrasi (62,5; 125; 250 dan 500  $\mu\text{g/mL}$ ) dan larutan kontrol sel selanjutnya ditambahkan sebanyak 500  $\mu\text{L}$  tiap sumuran. Replikasi dilakukan 3x (3 *coverslips*) kemudian diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% suhu  $37^\circ\text{C}$ . Bahan uji diambil dengan pipet dan dicuci dengan medium RPMI-1640 sebanyak 500  $\mu\text{L}$ . Suspensi lateks sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dengan konsentrasi  $2,5 \times 10^6/\text{mL}$  dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran sertadiinkubasi selama 60 menit dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% suhu  $37^\circ\text{C}$ . Sel dicuci dengan PBS sebanyak 500  $\mu\text{L}$  2 kali untuk menghilangkan RPMI kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi menggunakan metanol sebanyak 200  $\mu\text{L}$  selama 30 detik. Metanol diambil dan *coverslips* didiamkan hingga kering kemudian diberi pewarna Giemsa 10% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dalam akuades selama 20 menit. *Coverslips* dicuci dengan akuades hingga bersih (3-4 kali), dan dikeringkan pada suhu kamar. Jumlah makrofag yang mempunyai aktivitas fagositosis lateks dan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag aktif dihitung dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 200x pada beberapa lapang pandang sehingga jumlah makrofag yang diamati sekitar 100 makrofag (Sakti dkk., 2019). Aktivitas fagositosis makrofag dinilai berdasarkan parameter kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis (Hartini dkk., 2014).

## 2.9. Uji proliferasi limfosit

### 2.9.1. Isolasi limfosit

Protokol isolasi limfosit ini sudah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan tertuang dalam Surat Keterangan Layak Etik Nomor 021/EC-KEPK FKIK UMY/III/2021. Limfosit diisolasi dari organ limpa mencit galur BALB/c yang dilakukan secara aseptis. Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum menggunakan alkohol 70% (v/v) untuk diambil limpanya, kemudian diletakkan dalam cawan petri 50 mm yang telah berisi RPMI 1640 untuk menghasilkan suspensi limfosit dalam medium. Suspensi kemudian disentrifugasi pada 3200 rpm, dengan suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 4 menit. Supernatan dipisahkan dan pelet yang terbentuk disuspensikan dalam *Tris Buffered Ammonium Chloride* dan didiamkan pada suhu kamar selama 15 menit, untuk memperoleh suspensi ditambahkan RPMI dan disentrifugasi kembali selama 4 menit kemudian supernatan dibuang. Pencucian pelet sebanyak 2 kali dengan RPMI dan disuspensikan dalam medium komplet. Perhitungan sel kemudian dilakukan menggunakan hemositometer dan mikroskop *inverted*. Sel kemudian diinkubasi dalam inkubator 5%  $\text{CO}_2$  pada suhu  $37^\circ\text{C}$  (Winanta, 2017).

### 2.9.2. Uji proliferasi limfosit

Sel yang diinkubasi kemudian disuspensikan dalam medium komplit dan dibagikan masing-masing sebanyak 100  $\mu$ L pada *96-well multiwall plate*. Setelah itu sebanyak 10  $\mu$ L vaksin hepatitis B ditambahkan ke dalam setiap *well* dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian sampel uji berupa ekstrak ditambahkan sebanyak 100  $\mu$ L dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah proses inkubasi selama 48 jam, masing-masing *well* ditambahkan MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromida*] sebanyak 10  $\mu$ L, dilakukan inkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 4 jam. Selanjutnya, pada masing-masing *well* ditambahkan *reagen stopper* (10% SDS) dalam 50  $\mu$ L HCl 0,01 N. Untuk menghitung proliferasi limfosit maka digunakan indeks stimulasi (IS) proliferasi, absorbansi diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm (Sumardi dkk., 2013).

### 3. Hasil dan Pembahasan

Langkah awal penelitian adalah proses determinasi. Determinasi dilakukan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah benar tumbuhan umbi bit. Hasil determinasi umbi tanaman menyatakan bahwa umbi bit tersebut adalah benar tanaman *Beta vulgaris* L.

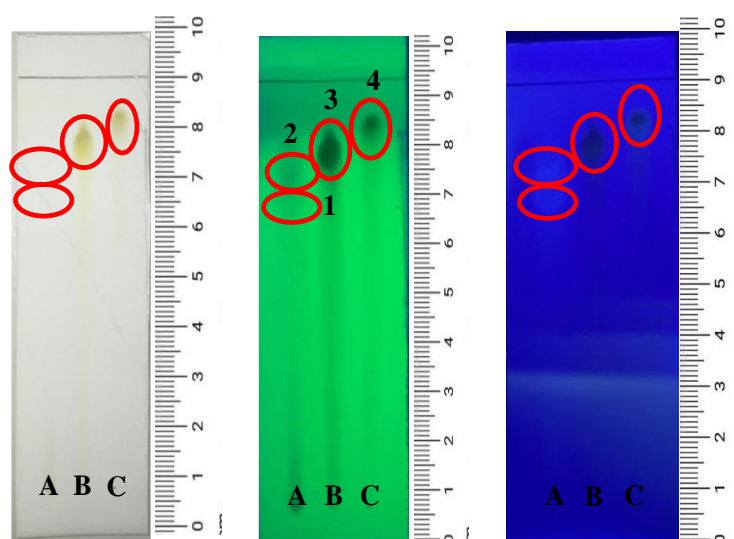
Ekstraksi etanol umbi bit dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% untuk mendapatkan hasil yang optimal dalam melarutkan suatu zat baik polar ataupun non polar. Etanol merupakan pelarut universal yang akan melarutkan senyawa baik polar maupun non polar. Ekstrak cair dari hasil maserasi kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental dengan berat yang konstan (Harborne, 1987). Ekstrak kental etanol umbi bit yang diperoleh setelah proses maserasi adalah sebanyak 178 g atau dengan nilai rendemen sebesar 35,6% dari jumlah simplisia.

Identifikasi flavonoid menggunakan fase diam silika GF<sub>254</sub> dan fase gerak metanol:air (9:1). Pemilihan fase diam dan fase gerak pada metode KLT didasarkan pada polaritas dan sifat dari flavonoid. Pembanding rutin dan kuersetin digunakan untuk menentukan senyawa aglikon dan glikon, kemudian direaksikan dengan amoniak.

Kromatogram hasil pengamatan KLT ini didapatkan bercak sampel umbi bit dengan (Rf) sebesar 0,72 dan 0,8 sedangkan Rf standar rutin adalah 0,83 dan Rf standar kuersetin adalah 0,9 baik pada pengamatan UV 254 nm maupun UV 366 nm. Kromatogram menunjukkan terdapat bercak dengan nilai Rf yang lebih mendekati dengan standar rutin, sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol umbi bit adalah senyawa flavonoid yang memiliki sifat dan karakteristik mirip rutin. Nilai Rf dapat diperoleh dari pengukuran antara jarak tempuh bercak dibandingkan dengan jarak tempuh fase gerak (Yuda

dkk., 2017). Hasil pengamatan kromatogram setelah diberi uap amoniak dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 1 dari bercak yang muncul baik sebelum maupun setelah diuapi amoniak. Berdasarkan pengamatan di bawah sinar UV 254 nm terjadi pemadaman dengan bercak berwarna coklat sedangkan pada sinar UV 366 nm terlihat berpendar dan di bawah sinar tampak berwarna kuning setelah diuapi amoniak yang dapat diduga sebagai senyawa flavonoid (Ardianti dan Guntarti, 2014). Struktur flavonoid memiliki gugus aoksokrom OH dengan atom O yang mempunyai sifat senang menarik elektron, dengan adanya basa amoniak akan memudahkan melepaskan H dan kemudian akan diikat oleh ammonia sehingga O memiliki 3 pasang elektron bebas.



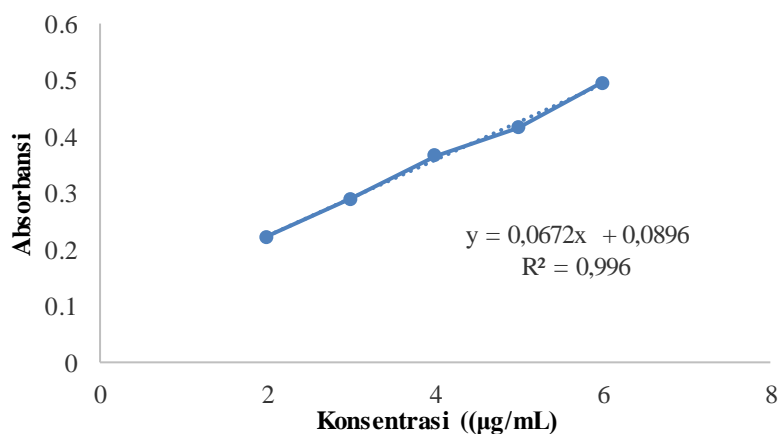
**Gambar 1.** Kromatogram ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris* L.) menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak metanol: air (9:1) setelah identifikasi dengan uap amoniak. (A) ekstrak etanol 70%; (B) standar rutin; (C) Standar kuersetin.

Untuk mengetahui seberapa besar nilai kadar flavonoid total yang terkandung pada ekstrak etanol umbi bit dilakukan analisis kuantitatif flavonoid total menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penentuan nilai kadar flavonoid total dari ekstrak etanol umbi bit dilakukan dengan kolorimetri dengan prinsip pengukuran yang berdasarkan pembentukan warna. Prinsip kolorimetri  $AlCl_3$  yaitu adanya pembentukan kompleks antara  $AlCl_3$  dengan gugus keto pada C-4 dan juga dengan gugus hidoksi pada C-3 atau C-4 yang berdampingan dengan flavon dan flavonol sehingga metode ini bisa digunakan sebagai penentuan nilai kadar flavonoid golongan flavon atau flavonol (Haresmita dan Pradani, 2022).

Optimasi panjang gelombang dilakukan untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan dalam pengukuran pada spektrofotometri UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari pengukuran kuersetin adalah 425. Menurut literatur



panjang gelombang maksimal dari kuersetin yaitu 415 nm (Selawa dkk., 2013). Hubungan linear antara absorbansi dengan konsentrasi menghasilkan  $R^2 = 0,9961$ . Dari hasil perhitungan, diperoleh hasil *intersep* sebesar 0,0672 dan nilai *slope* sebesar 0,0895 sehingga persamaan kurva baku adalah  $y = 0,0672x + 0,0895$ . Gambar kurva kalibrasi kuersetin pada panjang gelombang 425 nm dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kurva kalibrasi kuersetin pada panjang gelombang 425 nm sebagai standar pengukuran flavonoid total.

Persamaan tersebut digunakan sebagai pembanding dalam analisis kuantitatif pada pengukuran kandungan senyawa flavonoid kuersetin terhadap ekstrak etanol umbi bit. Nilai flavonoid total pada ekstrak etanol umbi bit diperoleh dengan cara memasukkan nilai absorbansi pada kurva standar kuersetin sehingga hasil kadar flavonoid total ekstrak etanol umbi bit adalah sebesar 1,43 mgEK/g. Penelitian Wiranata dan Sasadara (2022), menyebutkan kadar flavonoid dalam umbi dengan metode maserasi air bernilai  $274.16 \pm 0.67$  mgEK/g. Perbedaan kadar dapat disebabkan oleh perbedaan proses ekstraksi. Kadar flavonoid total ekstrak etanol umbi bit ekstrak dapat dilihat pada Tabel 1.

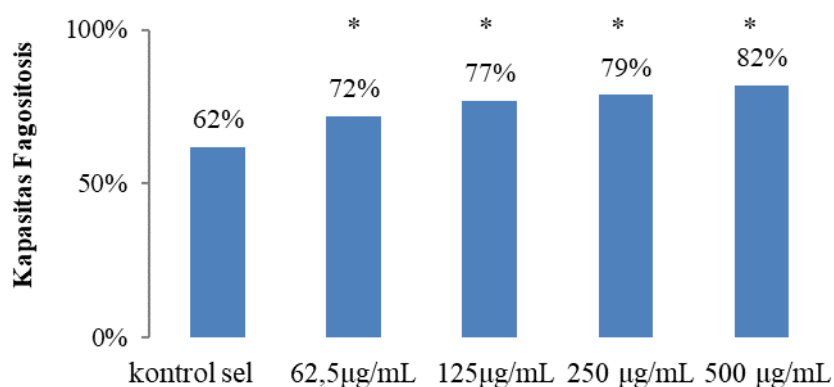
**Tabel 1.** Kadar flavonoid total ekstrak etanol umbi bit (*Beta vulgaris*).

Replikasi	Absorbansi	Kadar Flavonoid Total (mg EK/g sampel)	Nilai Rata-rata $\pm$ SD
1	0,2985	1,55	1,43 $\pm$ 0,13
2	0,2824	1,43	
3	0,2651	1,30	

Uji aktivitas fagositosis makrofag menggunakan parameter indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis. Indeks fagositosis berarti jumlah partikel lateks yang dapat terfagositosis oleh 100 makrofag yang aktif dan kapasitas fagositosis berarti jumlah makrofag aktif yang mampu memakan partikel lateks. Proses fagositosis ditandai dengan proses lateks dimakan makrofag. Lateks bersifat *inert* sehingga lateks dimakan makrofag karena adanya kontak mekanis secara kimiawi. Perbedaan kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis adalah

perlakuan dengan kontrol dilihat dari kemampuan sel makrofag memfagosit partikel lateks secara *in vitro*. Pengamatan aktivitas makrofag yang memakan lateks bertujuan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan ekstrak etanol umbi bit sebagai imunomodulator.

Hasil uji secara *in vitro* pada aktivitas fagositosis makrofag ekstrak etanol umbi bit menunjukkan ekstrak etanol umbi bit dengan kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis paling tinggi yaitu terdapat pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  (Kapasitas Fagositosis =  $82\% \pm 0,03$ ; Indeks Fagositosis =  $4,46 \pm 0,31$ ) dibandingkan dengan kontrol sel. Kapasitas fagositosis ekstrak etanol umbi bit dapat dilihat pada Gambar 3.

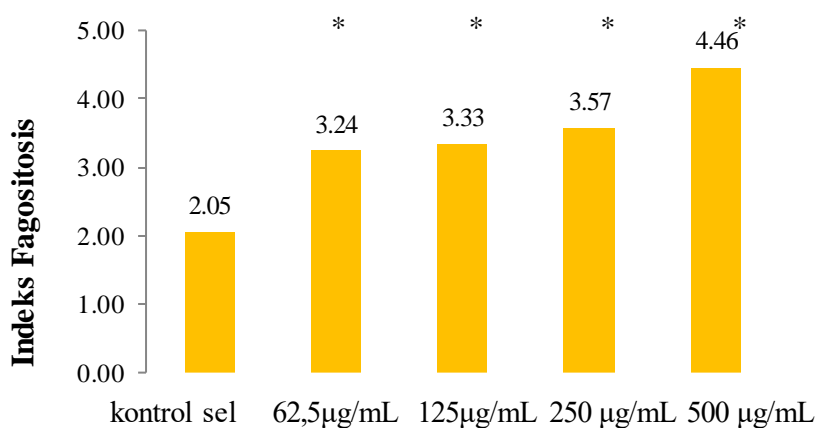


**Gambar 3.** Kapasitas fagositosis ekstrak etanol umbi bit. Keterangan: (Rata-rata $\pm$ SD, n=3,  $\alpha=0,5$ ) \* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Jika indeks fagositosis semakin besar maka akan semakin besar aktivitas setiap sel makrofag tersebut. Indeks fagositosis pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol umbi bit menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh lebih dari 2. Aktivitas imunomodulator suatu zat uji dapat diklasifikasikan berdasarkan indeks fagositosisnya, jika nilai indeks fagositosis  $<1,2$  maka dianggap berefek imunostimulan lemah, jika nilai indeks fagositosisnya antara 1,3 - 1,5 maka dianggap berefek imunostimulan sedang dan jika nilai indeks fagositosis  $>1,5$  maka dianggap mempunyai daya imunostimulan kuat (Wagner, 1990). Selain itu, aktivitas imunomodulator dapat juga dimediasi melalui mobilisasi leukosit dan limfosit (Ugwuokpe dkk., 2022). Indeks fagositosis sel makrofag ekstrak etanol umbi bit dapat dilihat pada Gambar 4. Gambar 4 menunjukkan bahwa ekstrak etanol umbi bit terbukti mempunyai kemampuan imunostimulan, semakin tinggi konsentrasi maka kemampuan imunostimulan juga akan semakin meningkat.

Ekstrak etanol umbi bit memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dilihat dari perbandingan kontrol sel dibandingkan dengan perlakuan pada berbagai konsentrasi baik dilihat dari kapasitas fagositosis maupun indeks fagositosis. Hasil uji secara *in vitro* menunjukkan ekstrak etanol umbi bit dengan indeks fagositosis paling tinggi yaitu

terdapat pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$  (Indeks Fagositosis =  $4,46 \pm 0,31$ ) dibandingkan dengan kontrol sel. Indeks fagositosis sel makrofag ekstrak etanol umbi bit terhadap lateks dapat dilihat pada gambar 4.



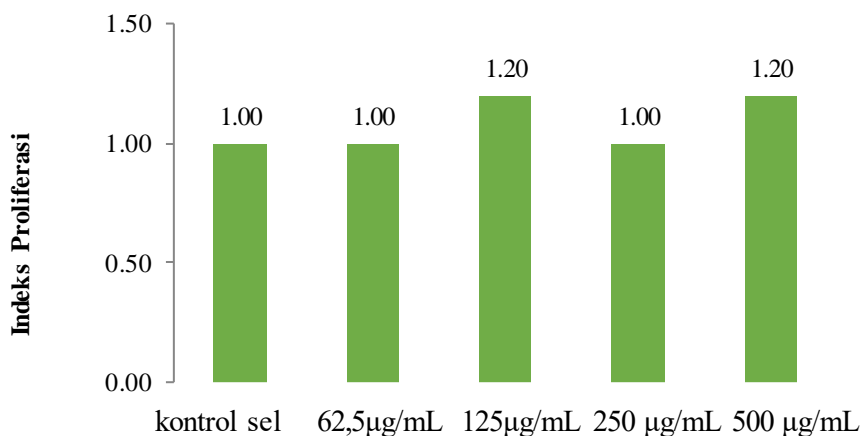
**Gambar 4.** Indeks fagositosis sel makofag ekstrak etanol umbi bit terhadap lateks. Keterangan: (Rata- rata $\pm$ SD,  $n=3$ ,  $\alpha=0,5$ ) \* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Aktivitas imunomodulator ekstrak etanol umbi bit terhadap respon imun spesifik dapat diduga karena adanya flavonoid yang dapat mengaktifkan sel NK untuk merangsang produksi interferon  $\gamma$ . IFN- $\gamma$  merupakan sitokin yang dapat mengaktifkan makrofag sehingga makrofag mengalami peningkatan aktivitas fagositosis secara cepat dan efisien dalam melawan antigen. IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh berbagai sel imun merupakan sitokin utama MAC (*Macrophage Activating Cytokin*) dan berperan besar dalam imunitas non-spesifik seluler (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009; Mukherjee dkk., 2014). Turunan kuersetin salah satunya kuersetin-3-rutinosida dalam daun *Urtica dioica* dapat mengurangi TNF- $\alpha$  dan sitokin inflamasi lainnya dengan menghambat faktor transkripsi genetik (Mukherjee dkk., 2014).

ELISA reader membaca intensitas warna kristal formazan setara dengan jumlah sel limfosit yang mengalami proliferasi dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, maka akan semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi) sehingga pengukuran aktivitas proliferasi sel limfosit dapat dilihat dari nilai indeks stimulasi (IS) (Ulfah dkk., 2017).

Parameter yang sering digunakan untuk melihat adanya aktivitas imunomodulator suatu komponen salah satunya dengan melihat kemampuannya dalam menstimulasi proliferasi sel limfosit. Proliferasi pada sel limfosit merupakan suatu proses pendewasaan dan perbanyakan sel melalui pembelahan sel atau disebut mitosis sehingga dapat menghasilkan sel-sel efektor aktif yang berperan pada respon imun spesifik dan non-spesifik untuk eliminasi mikroorganisme patogen dan zat asing lainnya. Mekanisme umum terjadinya proses proliferasi sel limfosit yaitu disebabkan terikatnya senyawa aktif (antigen) pada permukaan sel B dan sel

T. Indeks stimulasi pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol umbi bit (Gambar 5) menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh kurang dari 2. Konsentrasi 62,5 µg/mL dan konsentrasi 250 µg/mL diperoleh hasil 1. Konsentrasi 125 µg/mL dan konsentrasi 500 µg/mL diperoleh hasil 1,2.



**Gambar 5.** Indeks Proliferasi Sel Limfosit dari Ekstrak Etanol Umbi Bit. (Rata-rata±SD, n=3,  $\alpha=0,5$ ) \* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Parameter indeks stimulasi proliferasi secara umum dapat dikatakan lemah jika memiliki nilai IS antara 2 dan 3, dan dapat dikatakan positif jika memiliki nilai  $IS > 3$ , terutama jika diperoleh lebih dari satu konsentrasi (Pichler dan Tilch, 2004). Penelitian lain menunjukkan kombinasi ekstrak etanol sambiloto dengan ekstrak etanol temulawak mampu meningkatkan sistem imun dengan memicu proliferasi sel namun tidak lebih baik dibandingkan dosis tunggal dari ekstrak etanol temulawak (Azimah dkk., 2015). Ekstrak etanolik daun binahong dengan dosis 25, 50 dan 75 mg/kgBB tidak dapat meningkatkan aktivitas makrofag secara signifikan berdasarkan parameter indeks fagositosis dan kapasitas fagositosis (Sakti dkk., 2019). Ekstrak metanolik dan fraksi buah talok (*Muntingia calabura* L.) menunjukkan efek imunomodulator dengan mekanisme penghambatan inflamasi melalui penurunan ekspresi gen iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, dan IFN- $\gamma$  pada sel makrofag RAW 264.7 yang diinduksi lipopolisakarida (Sujono dkk., 2021). Berdasarkan parameter tersebut penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol umbi bit pada berbagai konsentrasi tidak memberikan efek terhadap proliferasi limfosit dan tidak mempunyai aktivitas dalam meningkatkan proliferasi limfosit akan tetapi dapat menekan proliferasi limfosit secara *in vitro* dan tidak memiliki potensi dalam meningkatkan respon imun adaptif. Perbedaan hasil dapat dipengaruhi karena beberapa faktor antara lain sampel, dosis, sumber sampel dan metode.

#### 4. Kesimpulan

Hasil identifikasi senyawa kimia dengan metode KLT pada ekstrak etanol umbi bit positif mengandung senyawa flavonoid. Kadar flavonoid total yang didapatkan dari ekstrak etanol

umbi bit adalah sebesar 1,43 mgEK/g ekstrak. Ekstrak etanol umbi bit memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kontrol namun tidak memiliki aktivitas dalam meningkatkan proliferasi limfosit sehingga tidak memiliki potensi dalam meningkatkan respon imun adaptif.

### Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Muhammadiyah Yogyakarta sebagai penyandang dana penelitian dan Laboratorium Sel Kultur Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah menyediakan koleksi sel serta dukungannya sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

### Deklarasi Konflik Kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

### Daftar Pustaka

- Anam, C., Kawiji, K., dan Setiawan, R. D. (2013). Kajian Karakteristik Fisik dan Sensori serta Aktivitas Antioksidan dari Granul Effervescent Buah Beet (*Beta vulgaris*) dengan Perbedaan Metode Granulasi dan Kombinasi Sumber Asam. *Jurnal Teknosains Pangan*, 2(2), 21–28.
- Ardianti, A., dan Guntarti, A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Eter Hasil Hidrolisis Infusa Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan Metode DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl). *Pharmaciana, Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 4(1), 1–8.
- Asra, R., Yetti, R. D., Ratnasari, D., dan Nessa, N. (2020). Studi Fisikokimia Betasianin dan Aktivitas Antioksidan dari Umbi Bit Merah (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Pharmaceutical And Sciences*, 3(1), 14–21. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v3i1.35>
- Azimah, D., Yuswanto, A., Wahyono, W., Santosa, D., and Setyowati, E. P. (2015). Efek Imunomodulator dari Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) dan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Balb/C secara In Vitro. *Traditional Medicine Journal*, 21(3), 157–168.
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. (2009). *Imunologi Dasar* (Edisi VIII). Balai Penerbit Kedokteran Universitas Indonesia.
- Garmana, A. N., Sukandar, E. Y., and Fidrianny, I. (2014). Activity of Several Plant Extracts Against Drug-sensitive and Drug-resistant Microbes. *Procedia Chemistry*, 13, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.021>
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan: Vol. Terbitan Kedua*. Penerbit ITB Bandung.
- Haresmita, P. P., dan Pradani, M. P. K. (2022). Determination of Total Flavonoid in Jamu “X” with Uv-Visible Spectrophotometric Methods. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 8, 177–184. <https://doi.org/10.31603/pharmacy.v8i2.6864>
- Hartini, Y. S., Wahyuono, S., Widyarini, S., and Yuswanto, A. (2014). In vivo immunomodulatory effect and histopathological features of mouse liver and kidney treated with neolignans isolated from red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) leaf. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(10), 1609–1614. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i10.6>
- Kemenkes RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Suplemen II: Vol. Edisi I* (First). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

- Mukherjee, P. K., Nema, N. K., Bhadra, S., Mukherjee, D., Braga, F. C., and Matsabisa, M. G. (2014). Immunomodulatory leads from medicinal plants. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 13(2), 1–22.
- Munawaroh, R., Siswadi, S., Setyowati, E. P., Murwanti, R., and Hertiani, T. (2018). Correlation Between Total Flavonoid Contents and Macrophage Phagocytosis Activity of Fractions From Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) Barks Ethanolic Extract In Vitro. *Majalah Obat Tradisional*, 23(1), 47. <https://doi.org/10.22146/mot.30882>
- Patle, T. K., Shrivastava, K., Kurrey, R., Upadhyay, S., Jangde, R., and Chauhan, R. (2020). Phytochemical Screening and Determination of Phenolics and Flavonoids in *Dillenia pentagyna* Using UV-Vis and FTIR Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 242, 118717.
- Pichler, W. J., and Tilch, J. (2004). The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, 59(8), 809–820. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00547.x>
- Podungge, M. R., Salimi, Y. K., dan Duengo, S. (2017). Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Miana (*Coleus scutelleroides* Benth.). *Jurnal Entropi*, 12(1), 67–74.
- Radji, M. (2015). *Imunologi dan Virologi* (4 ed.). ISFI Penerbitan.
- Rodríguez, E. T., Frias, M. de la C., Galardis, M. B., and Leon, J. A. M. (2018). In vitro antibacterial activity of dried extract from *Anredera vesicaria* rhizomes. *Journal Of Advance in Plants and Agricultural Research*, 3(3), 237–239.
- Sakti, D. S., Haresmita, P. P., Yuniarti, N., and Wahyuono, S. (2019). Phagocytosis Activity of Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore.) Steenis) from Secang, Magelang, Central Java, Indonesia. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*, 16(1), 7–13. <https://doi.org/10.24071/jpsc.001693>
- Selawa, W., Runtuwene, M. R. J., dan Citraningtyas, G. (2013). Kandungan Flavonoid dan Kapasitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia*(Ten.) Steenis). *Pharmakon, Jurnal Ilmiah Farmasi Unsrat*, 2(01), 18–22.
- Selvira, U. A., Fitriani, H., dan Nurbaiti, N. (2021). Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Bit (*Beta vulgaris* L.) terhadap Gambaran Hepatosit pada Hati Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley yang Diinduksi Soft Drink. *Tunas Medika Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 7(2), 1–8.
- Setiawan, M. A. W., Nugroho, E. K., dan Lestario, L. N. (2016). Ekstraksi Betasianin Dari Kulit Umbi Bit (*Beta vulgaris*) sebagai Pewarna Alami. *Agric Jurnal Ilmu Pertanian*, 27(1), 38–43. <https://doi.org/10.24246/agric.2015.v27.i1.p38-43>
- Suharyanto, S., dan Hayati, T. N. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Buah Gambas (*Luffa acutangula* (L.) Roxb.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Pharmakon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1), 82–88.
- Sujono, T. A., Kusumowati, I. T. D., dan Munawaroh, R. (2021). Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Metanol dan Fraksi buah Talok (*Muntingia calabura* L.) pada Sel RAW 264.7. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 6(2), 82. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v6i2.47009>
- Sujono, T. A., Nurrochmad, A., Lukitaningsih, E., dan Nugroho, A. E. (2022). Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Petroleum Eter Umbi Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) pada Mencit Balb/c yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 7(2), 162. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v7i2.56212>
- Sumardi, Hertiani, T., and Sasmito, E. (2013). Ant Plant (*Myrmecodia tuberosa*) Hypocotyl Extract Modulates TCD4+ and TCD8+ Cells Profile of Doxorubicin-Induced Immune-Suppressed Sprague Dawley Rats In Vivo. *Scientia Pharmaceutica*, 81(4), 1057–1069. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1302-03>

- Sygitowicz, G., and Sitkiewicz, D. (2020). Molecular mechanisms of organ damage in sepsis: An overview. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(6), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.09.004>
- Ugwuokpe, A. L., Onah, C. M., Nnadi, C. O., and Omeje, E. O. (2022). Evaluation of Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of Extract of *Beta vulgaris* Linn (Chenopodiaceae) Root Tuber. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 6(2), 256–259.
- Ulfah, M., Cahyani, V. S. N., dan Kinasih, I. (2017). Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Dan Proliferasi Sel Limfosit Mencit Galur Balb/C Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. *Momentum*, 13(2), 63–71.
- Wagner, H. (1990). Search for Plant Derived Natural Products with Immunostimulatory Activity: Recent Advances. *Pure and Applied Chemistry*, 62(7), 1217–1222. <https://doi.org/10.1351/pac199062071217>
- Wardhani, L. K., dan Sulistyani, N. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Pharmaciana, Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2(1), 1–16.
- Winanta, A. (2017). *Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Kulit Batang Faloak (Sterculia quadrifida R.br.) secara In Vitro dan In Vivo* [Thesis]. Universitas Gadjah Mada.
- Wiranata, I. G., dan Sasadara, M. M. V. (2022). Pengaruh Pelarut dan Metode Ekstraksi terhadap Kandungan Metabolit Sekunder dan Nilai IC50 Ekstrak Umbi Bit (*Beta vulgaris* L.). *Usadha Jurnal Integrasi Obat Tradisional*, 2(1), 7–13. <https://doi.org/10.36733/usadha.v2i1.5277>
- Yuda, P. E. S. K., Cahyaningsih, E., dan Winariyanthi, N. P. Y. (2017). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.). *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 3(2), 61–70.



© 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).